

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů



Šimon Antoš

Buněčná senescence a choroby spojené se stárnutím
Cellular senescence and ageing-associated diseases

Bakalářská práce

Školitel: MUDr. Zdeněk Hodný, CSc.

Praha, 2019

Poděkování

Děkuji svému školiteli MUDr. Zdeňku Hodnému, CSc. za cenné odborné konzultace a vstřícnost při vedení bakalářské práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 05. 2019

Šimon Antoš

Abstrakt

V posledních letech stále více nálezů podporuje roli buněčné senescence v chorobách spojených se stárnutím. Buněčná senescence figuruje v těchto chorobách na několika úrovních a u několika z nich přímo podporuje patogenezi. Cílem této bakalářské práce je shrnout nejnovější poznatky týkající se mechanismu a působení buněčné senescence v patogenezi těchto chorob, jmenovitě nádorových onemocnění, aterosklerózy, osteoartritidy, neurodegenerativních onemocnění Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy nemoci a roztroušené sklerózy, obezity a diabetes mellitus druhého typu.

Klíčová slova: buněčná senescence, stárnutí, nádorová onemocnění, ateroskleróza, osteoartritida, Alzheimerova choroba, Parkinsonova nemoc, roztroušená skleróza, obezita, diabetes mellitus druhého typu

Abstract

In the last years more evidence supports the role of cellular senescence in ageing-associated diseases. Cellular senescence plays a role in these diseases on multiple levels and often directly supports their pathogenesis. The goal of this bachelor thesis is to summarize latest knowledge regarding the mechanism and the effect cellular senescence has in ageing-associated diseases, namely cancer, atherosclerosis, osteoarthritis, neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and multiple sclerosis, obesity and diabetes mellitus type two.

Key words: cellular senescence, ageing, cancer diseases, atherosclerosis, osteoarthritis, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, multiple sclerosis, obesity, diabetes mellitus type two

Seznam použitých zkratk

ACR – poměr albuminu ku kreatininu (test na indikaci dysfunkce ledvin)

Akt – proteinkináza B

ALISE – akumulace lipidů v senescenci (*accumulation of lipids in senescence*)

ANT2 – *adenine nucleotide translocase-2*

APP – amyloidový prekurzorový protein

AS – ateroskleróza

ASCs – stromální/progenitorové buňky odvozené z tukové tkáně (*adipose-derived stromal/progenitor cells*)

Ay – *lethal yellow* mutace

Aβ42 – amyloid β42

BMI – index tělesné hmotnosti (*body mass index*)

BS – buněčná senescence

Cd68 – *cluster of differentiation 68*

DMDT – diabetes mellitus druhého typu

EcrG4 – *esophageal cancer related-gene 4*

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*

EMT – epiteliálně mezenchymální tranzice (*epithelial to mesenchymal transition*)

FPR2 – formylpeptidový receptor 2 (*formylpeptide receptor 2*)

GROα – *growth-regulated protein α*

hMADS – lidské multipotentní kmenové buňky odvozené z tukové tkáně (*human multipotent adipose-derived stem cells*)

ICAM-1 – intercelulární adhezivní molekula 1 (*intercellular adhesion molecule 1*)

IGF-1 – *insulin-like growth factor 1*

IL – interleukin

IκBα – NF-κB inhibitor α

JAK – Janus kináza

LDL – nízkodenzitní lipoprotein

MCP – *monocyte chemoattractant protein*

MMP – matrixová metaloproteináza

NADPH oxidáza, NOX – nikotínadenín dinukleotidfosfát oxidáza

NF-κB – nukleární faktor κB

NSPCs – neurální kmenové/progenitorové buňky (*neural stem/progenitor cells*)

p38 MAP kináza – p38 mitogenem aktivovaná protein kináza

PAI-1 – inhibitor plazminogenového aktivátoru 1 (*plasminogen activator inhibitor 1*)

PTEN – *phosphatase and tensin homolog*

Rb – retinoblastomový protein

ROS – reaktivní formy kyslíku

RR – *relaps remittentní* forma roztroušené sklerózy

SA β-galaktosidáza – se senescencí spojená β-galaktosidáza (*senescence-associated β-galactosidase*)

SASP – se senescencí asociovaný sekreční fenotyp (*senescence-associated secretory phenotype*)

Sirt1 – sirtuin 1

SR – *sekundárně progresivní* forma roztroušené sklerózy

TGF-β – transformující růstový faktor β (*transforming growth factor β*)

TNF-α – faktor nádorové nekrózy α (*tumor necrosis factor α*)

TRF2 – *telomeric repeat-binding factor 2*

VCAM-1 – vaskulární buněčná adhezivní molekula 1 (*vascular cell adhesion molecule 1*)

VSMCs – vaskulární buňky hladké svaloviny (*vascular smooth muscle cells*)

WHO – Světová zdravotnická organizace (*World Health Organization*)

ΔPolη – myší model deficientní na polymerázu η

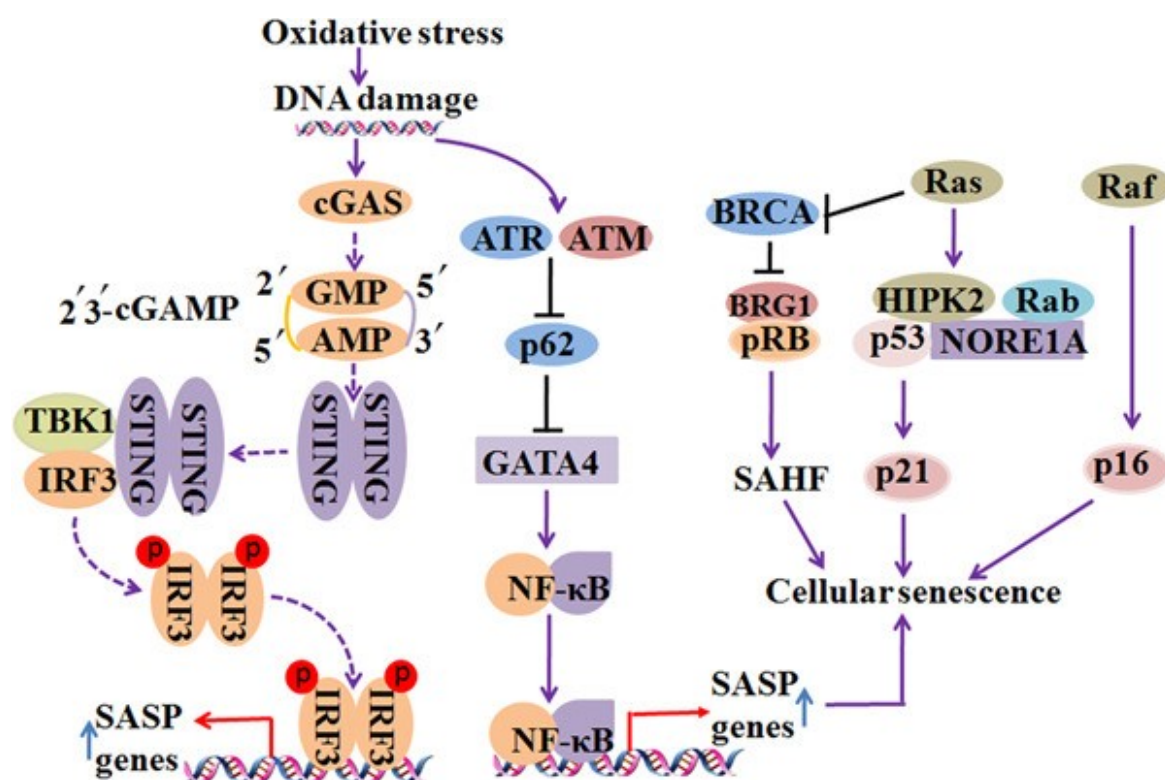
ΔTert – myší model deficientní na telomerázu (*telomerase reverse transcriptase deficient mice*)

OBSAH

Úvod.....	1
1. Nádorová onemocnění	4
1.1. Buněčná senescence jako protinádorová bariéra	4
1.2. Negativní efekty buněčné senescence v karcinogenezi	6
2. Úloha buněčné senescence v ateroskleróze	8
3. Úloha buněčné senescence v osteoartritidě.....	11
4. Neurodegenerativní onemocnění a buněčná senescence	11
4.1. Alzheimerova choroba.....	11
4.2. Parkinsonova nemoc.....	13
4.3. Roztroušená skleróza	14
5. Úloha buněčné senescence v patogenezi obezity.....	16
6. Diabetes mellitus druhého typu a buněčná senescence.....	19
Závěr.....	23
Použitá literatura	24

Úvod

Buněčnou senescenci (BS) poprvé popsali Hayflick a Moorhead (1961) ve své práci „*The serial cultivation of human diploid cell strains*“. Od té doby je BS intenzivně studovaným tématem zabíhajícím do různých oblastí lidské fyziologie, molekulárních mechanismů a patogeneze nemocí. BS lze obecně definovat jako zástavu buněčného cyklu v reakci na různé stresové faktory, přičemž v mechanismech BS hraje povětšinou centrální roli poškození DNA (Obr. 1) (shrnutí ve Wei & Ji 2018). Mezi faktory způsobující BS patří například aktivace onkogenů či vystavení buněk chemoterapeutikům (viz kapitola Nádorová onemocnění).

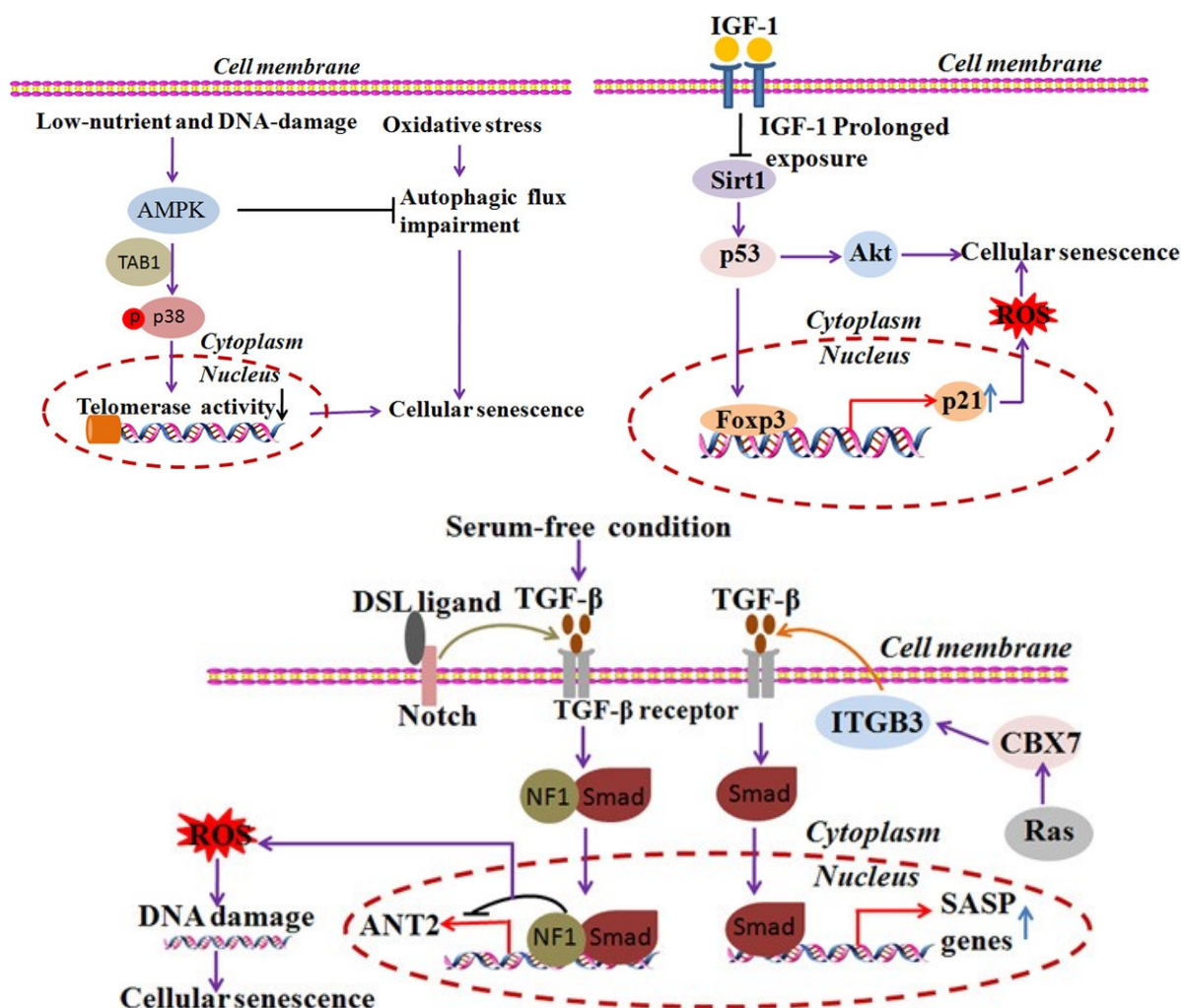


Obrázek 1 – Schéma znázorňující mechanismus, kterým oxidační stres a onkogeny Ras a Raf vedou k BS a se senescencí asociovanému sekrečnímu fenotypu SASP (*senescence-associated secretory phenotype*). Onkogeny Ras a Raf indukují BS přes p53, p21 a p16 – vpravo. Oxidační stres vede k poškození DNA a jím vyvolané signalizaci – vlevo. Pro iniciaci exprese genů SASP je důležitá hlavně aktivace transkripčního faktoru NF-κB – uprostřed. Plné šipky představují prokázané interakce, kdežto přerušované představují domnělé interakce. Převzato z (Wei & Ji 2018).

Na mechanismu rozvoje BS se podílí několik signálních drah, v kontextu této práce je důležité zmínit signální dráhy spojené s p53, p38 MAP kinázou a cytokinem TGF-β (Obr. 2) (shrnutí ve Wei & Ji 2018).

Senescenční buňky secernují celou řadu látek, které působí na buňky okolních tkání (viz například (Coppé *et al.* 2008)). Tento takzvaný se senescencí asociovaný sekreční fenotyp SASP (*senescence-associated secretory phenotype*) představuje širokou škálu faktorů

produkovaných a secernovaných senescenčními buňkami v signifikantně vyšším množství následkem indukce senescence (Coppé *et al.* 2008). Byla identifikována celá řada komponent SASP, z nichž lze uvést cytokiny (IL-1 α , IL-6, IL-7, IL-8, MCP-1, MCP-2), růstové faktory (GRO α), povrchové molekuly (ICAM-1), faktory buněčného přežití (osteoprotegerin) (Coppé *et al.* 2008). Pro další informace ohledně SASP odkazují na shrnutí (Borodkina *et al.* 2018).



Obrázek 2 – Znázornění některých signálních drah účastnících se BS: dráha p38 MAP kinázy, dráha p53 a TGF- β . A) p38 MAP kináza je aktivovaná signalizací způsobenou sníženým množstvím živin a poškozením DNA. Fosforylovaná p38 MAP kináza může inhibovat aktivitu telomerázy a tím způsobovat BS. B) Dlouhodobá expozice IGF-1 inhibuje Sirt1 deacetylázu, čímž se zvyšuje acetylace p53, která p53 stabilizuje. p53 způsobuje BS přes efekторы Akt a p21. C) Signální dráha TGF- β inhibuje ANT2, což způsobuje vyšší produkci reaktivních forem kyslíku a poškození DNA vedoucí k BS. TGF- β je i součástí signalizace aktivované onkogenem Ras a může být podpořena i prostřednictvím signální dráhy Notch1. Převzato z (Wei & Ji 2018).

Noren Hooten a Evans (2017) ve své práci shrnuli metody, kterými lze senescenci indukovat a kvantifikovat na základě běžně užívaných biomarkerů senescence. Z uvedených metod lze zmínit například stanovení enzymatické aktivity β -galaktosidázy, která je zvýšená u senescenčních buněk (tzv. se senescencí asociovaná β -galaktosidáza), detekci proteinů p16^{INK4a}, p21^{waf1} (p21) či p53 a proteinů SASP pomocí imunoblotu a ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (shrnutí v Noren Hooten & Evans 2017). Zde je nutné zdůraznit, že žádný z těchto biomarkerů není striktně specifický pro BS, a proto je nutno používat k detekci BS kombinaci těchto biomarkerů, ne všechny senescenční buňky vykazují stejné biomarkery a konkrétní biomarkery mohou být přítomny i u jiných než senescenčních buněk (shrnutí v Noren Hooten & Evans 2017).

V posledních letech byla získána celá řada důkazů o úloze senescenčních buněk v patogenezi chorob souvisejících se stárnutím a cílem této práce je shrnout dosud objasněné mechanismy účasti BS u nádorových onemocnění, aterosklerózy, osteoartritidy, obezity, diabetu druhého typu a neurodegenerativních onemocnění zahrnujících Alzheimerovu chorobu, Parkinsonovu chorobu a roztroušenou sklerózu.

1. Nádorová onemocnění

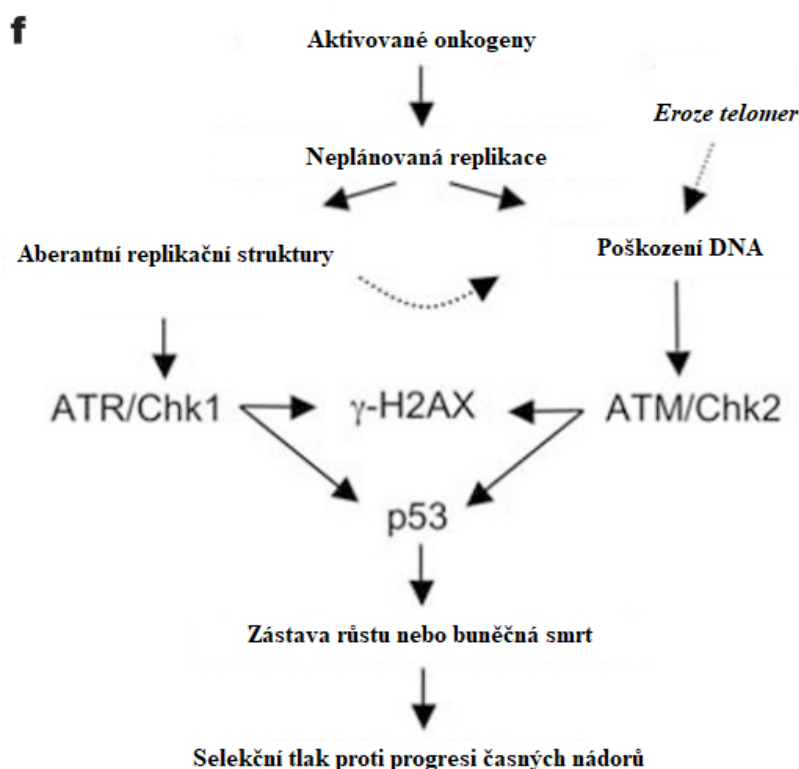
BS a její role u nádorových onemocnění je aktivně a dlouhodobě studované téma. Role senescence u nádorových onemocnění je dvojího typu. BS jednak představuje primární protinádorovou bariéru, jednak přítomnost senescenčních buněk může podporovat tvorbu nádorů a maligní potenciál nádorových buněk.

1.1. Buněčná senescence jako protinádorová bariéra

Serrano *et al.* (1997) ukázali, že onkogenní *ras* způsobuje u primárních fibroblastů stálou zástavu buněčného cyklu v G1 fázi doprovázenou zvýšením hladin p53, p21 a p16. Zástavě buněčného cyklu v G1 fázi následkem indukce *ras* se podařilo předejít vyřazením signálních drah p53 nebo p16/Rb v hlodavčích buňkách, nikoliv však v lidských buňkách (Serrano *et al.* 1997). U lidských fibroblastů vyřazení dráhy p53 či p16/Rb nepředěšlo zástavě buněčného cyklu indukované *ras*, nicméně toho bylo dosaženo pomocí virového onkoproteinu E1A (Serrano *et al.* 1997), jehož exprese již dříve dokázala překonat i ozářením vyvolanou zástavu buněčného cyklu v G1 závislou na p53 (Lowe *et al.* 1993). Obranná funkce BS v karcinogenezi se hypoteticky může projevit selektivním tlakem na mutace p53 a p16, které by zabránily G1 bloku (Serrano *et al.* 1997).

Později bylo zjištěno, že onkogen *ras* může vyvolat senescenci i u myší *in vivo* především v premaligním stádiu vývoje nádorů, kdežto neléčené plně rozvinuté maligní nádory již obvykle neobsahují senescenční buňky, dle autorů nejspíše z důvodu ztráty senescenčních efektorů p16^{INK4a} či p53 (Collado *et al.* 2005).

Onkogeny jsou schopné způsobovat poškození DNA, které souvisí s BS (Bartkova *et al.* 2005). Poškození DNA vyvolané onkogeny či dysfunkcí telomer pravděpodobně indukuje signalizační dráhy odpovědi na poškození DNA, které poté vedou k zastavení buněčného cyklu či apoptóze a tedy i obraně vůči změně premaligních lézí na maligní (Obr. 3) (Bartkova *et al.* 2005).



Obrázek 3 – Model odpovědi na poškození DNA vyvolané onkogeny či dysfunkčními telomerami. Přeloženo a převzato z (Bartkova *et al.* 2005).

Za nádorovou progresi jsou nejspíše zodpovědné buňky s poškozenou signalizací odpovědi na poškození DNA (například s defektem p53), u kterých neproběhne zástava buněčného cyklu, senescence či apoptóza (Bartkova *et al.* 2005). Jak bylo ukázáno dále, aktivované onkogeny vyvolávají replikační stres, který vede k poškození DNA způsobující BS, a tak aktivují ochranu před vznikem maligních nádorů (Bartkova *et al.* 2006). Podobný mechanismus byl popsán i u lymfomů (Braig *et al.* 2005).

Bariérovou roli BS podporují i nálezy senescenčních buněk u pigmentových névů, ve kterých exprese onkogenu B-RAF vyvolává senescenci melanocytů, což zřejmě představuje mechanismus limitující zvrát premaligních lézí v zhoubné melanomy (Michaloglou *et al.* 2005).

Chen *et al.* (2005) analyzovali nádorové supresory PTEN a p53. Specifická deficiencie obou supresorů *Pten* i *Trp53* v prostatě u myši vedla k masivnímu nárůstu nádorového bujení, kdežto pouhá ztráta *Pten* sice vedla k nádorům, ale žádná z myši nezemřela na rakovinu prostaty (Chen *et al.* 2005). Lehčí fenotyp u myši deficientních pouze pro *Pten* v prostatě byl viditelný i při testování přežití zvířat; myši deficientní pro *Pten* byly totiž schopné přežít

nejméně deset měsíců oproti myším specificky deficientním v prostatě pro *Pten* a *Trp53*, které se nedožily více jak sedmi měsíců (Chen *et al.* 2005). Tato zjištění ukazují na kooperaci PTEN s p53 při potlačování karcinogeneze (Chen *et al.* 2005). Experimenty s myšimi primárními embryonálními fibroblasty dále odhalily, že akutní ztráta *Pten* vede k indukci BS závislé na p53, což potvrdily i experimenty s myšimi nádory prostaty *in vivo* (Chen *et al.* 2005). Zdá se tedy, že právě BS závislá na p53 je ochranou před nádorovými mutacemi v *Pten* (Chen *et al.* 2005).

Se zajímavými výsledky přišla i studie Xue *et al.* (2007) demonstrující interakci vrozené imunity a BS při přirozeném odstraňování nádorových buněk. Podobně, jako bylo popsáno výše (Serrano *et al.* 1997), potlačení exprese p53 a aktivace exprese Ras v hepatoblastech a jejich následná transplantace do jater myší vedla k invazivnímu nádorovému bujení (Xue *et al.* 2007). Co je ale důležité, následná reaktivace exprese p53 v nádorových buňkách vedla k odstranění nádorových buněk (Xue *et al.* 2007). V další sérii experimentů autoři prokázali, že nádorové buňky následkem reaktivace p53 přešly do stavu senescence (Xue *et al.* 2007). Senescenční buňky poté stimulovaly vrozenou imunitní odpověď, která byla zodpovědná za jejich následné odstranění (Xue *et al.* 2007). Vzniklé senescenční nádorové buňky stimulovaly imunitní odpověď nejspíše produkovanou škálou prozánětlivých cytokinů (například MCP-1) (Xue *et al.* 2007).

1.2.Negativní efekty buněčné senescence v karcinogenezi

BS nemá na vývoj nádorového bujení pouze pozitivní účinky, jak ukazují experimenty se senescenčními fibroblasty, které zřejmě dokáží nejen stimulovat proliferaci premaligních a maligních epiteliálních buněk z velké části pomocí faktorů SASP, ale i celkově karcinogenezi, o čemž svědčí experimenty *in vivo* (Krtolica *et al.* 2001). Není bez zajímavosti, že stimulace nádorového růstu senescenčními buňkami kvalitativně nezávisela na induktoru senescence a k indukci vyššího růstu premaligních epiteliálních buněk stačilo pouze relativně malé množství senescenčních buněk (Krtolica *et al.* 2001). Existují také důkazy nasvědčující schopnosti senescenčních fibroblastů vyvolávat přeměnu epiteliálních buněk na mezenchymální (*epithelial to mesenchymal transition*, EMT) (Krtolica *et al.* 2001). Autory nalezené negativní vlivy senescenčních fibroblastů na karcinogenezi ukazují na princip *antagonistické pleotropie*, BS by tak chránila mladý organismus před nádorovým bujením, kdežto ve stáří by se situace obrátila (Krtolica *et al.* 2001).

O stimulačních účincích BS a SASP na růst okolních buněk svědčí i další experimenty. Castro *et al.* (2004) ukázali vyšší expresi IL-8 senescenčními epiteliálními buňkami prostaty a

schopnost exprimovaného IL-8 přímo podporovat proliferaci nesenescentních epiteliálních buněk a immortalizovaných epiteliálních buněk. V kontextu jejich práce měl tedy IL-8 senescenčních epiteliálních buněk přímý vliv na patogenezi benigní hyperplazie prostaty (Castro *et al.* 2004). Podobně dokázala i specifická genová exprese senescenčních fibroblastů indukovat růst immortalizovaných, metastatických a tumorigenních epiteliálních buněčných linií prostaty, z velké části právě pomocí parakrinních faktorů (Bavik *et al.* 2006). Výrazně výše byly exprimovány senescenčními fibroblasty například IL-8 či MMP2 (Bavik *et al.* 2006).

Nejen IL-8, ale i další cytokiny SASP dokáží podporovat maligní potenciál nádorových buněk. Coppé *et al.* (2008) ukázali, že IL-6 a IL-8 stimuluje EMT a invazivitu relativně neagresivních rakovinných buněk. SASP je přímo spojen s nádorovými mutacemi v p53 a RAS, neboť je, zdá se, posílen pomocí onkogenního RAS a zároveň potlačován pomocí p53 (Coppé *et al.* 2008). Výsledky dané práce dále naznačují, že chemoterapeutikum mitoxantron způsobuje senescenci linií epiteliálních buněk a fibroblastů *in vitro*, včetně indukce SASP a senescence v lidských nádorových epiteliálních buňkách prostaty *in vivo* (Coppé *et al.* 2008).

Negativní účinky chemoterapie spojené s BS podporují další nálezy. Demaria *et al.* (2017) popsali schopnost chemoterapeutik (například doxorubicinu) vyvolávat senescenci a prozánětlivý SASP u lidských a myších buněk. BS by tak mohla být přímo spojená s negativními účinky chemoterapie, což Demaria *et al.* (2017) dokázali eliminací senescenčních buněk. Eliminace senescenčních buněk do určité míry zvrátila negativní vliv doxorubicinu tím, že potlačila cirkulující prozánětlivé faktory, pozitivně působila na funkci hematopoetických progenitorových buněk a předešla rozvoji srdeční dysfunkce. Přibližně 80% myší léčených doxorubicinem postupně vyvinulo metastáze, což je v přímém kontrastu s pouze 20% myší léčených doxorubicinem, u kterých byly odstraněny senescenční buňky (Demaria *et al.* 2017). Eliminace senescenčních buněk také zlepšila přežití myší po relapsu nádorového bujení a snížila únavu vyvolanou chemoterapií (Demaria *et al.* 2017). Spojení únavy s BS po chemoterapii podpořili autoři i u lidí, neboť senescenční zátěž korelovala s rizikem vzniku únavy následkem chemoterapie (Demaria *et al.* 2017). Z jejich výsledků tedy vyplývá, že chemoterapie způsobuje BS i v nenádorových buňkách a ta přispívá k negativním vedlejším účinkům chemoterapie (Demaria *et al.* 2017).

Celkově má tedy BS jak pozitivní tak negativní roli u nádorových onemocnění. Uvedené studie nasvědčují, že BS zabráňuje nádorovému bujení v reakci na onkogeny. Její vyvolání v nádorových buňkách a následná interakce s vrozeným imunitním systémem vede k odstranění

senescenčních nádorových buněk, na druhou stranu BS a s ní spojený SASP podporují růst nádorů a jsou zároveň součástí i negativních vedlejších účinků chemoterapie.

2. Úloha buněčné senescence v ateroskleróze

Ateroskleróza (AS) je zánětlivé onemocnění tepen. Průběh aterosklerózy se všemi přidruženými komplikacemi může vést až k smrti pacienta, neboť přítomnost AS zvyšuje riziko infarktu myokardu či ischemické choroby srdeční (shrnutí ve Wang & Bennett 2012). Mezi rizikové faktory vzniku AS patří mimo jiné zvýšený krevní tlak (hypertenze), zvýšená hladina LDL a vyšší věk (shrnutí ve Wang & Bennett 2012).

Patogenezi AS lze stručně charakterizovat jako vznik zánětlivých plaků v tepnách s jejich následným zúžením (shrnutí ve Weber & Noels 2011). Plak se začne formovat na základě změny struktury endotelu vystavením negativně nabitých proteoglykanů a dysfunkce endoteliálních buněk, které zvyšují expresi adhezivních molekul VCAM-1 a ICAM-1 (Kwon *et al.* 2008; shrnutí ve Weber & Noels 2011; shrnutí ve Wang & Bennett 2012). Monocyty prostupují diapedézou pomocí adhezivních molekul přes endoteliální buňky do *tunica intima*, kde posléze dozrávají v makrofágy, které pohlcují oxidované LDL a mění se na zánětlivé pěnové buňky (shrnutí v Sakakura *et al.* 2013). Postupně dojde k tvorbě nekrotického jádra tvořeného hlavně buňkami podléhajícími apoptóze, pozůstatky buněk a krystalickými formami cholesterolu (shrnutí ve Weber & Noels 2011). Vaskulární buňky hladké svaloviny (*vascular smooth muscle cells*, VSMCs) proliferují a překryjí plak vrstvou kolagenu (shrnutí ve Wang & Bennett 2012). V pozdějších fázích VSMCs podléhají apoptóze, krom jiného i interakcí takzvaných receptorů smrti Fas a jejich ligandů FasL produkovaných například makrofágy (shrnutí v Bennett 1999; shrnutí ve Wang & Bennett 2012). Fibrózní povlak, který se tvoří na plaku, se zúží a může dojít až k tvorbě trhliny, na kterou následně nasedají krevní destičky (shrnutí ve Wang & Bennett 2012). VSMCs sice mohou opravit jednotlivé trhliny, ale postupně celý proces vede ke zúžení tepny a s tím spojeným komplikacím (shrnutí ve Wang & Bennett 2012).

BS vstupuje do procesu aterosklerózy v několika různých fázích. BS může postupně ovlivnit všechny tři hlavní složky účastnící se aterosklerózy: endoteliální buňky, VSMCs a infiltrující imunitní buňky.

Endoteliální buňky izolované ze starších zdravých osob vykazují vyšší aktivaci a translokaci NF- κ B, což souvisí s vyšší expresí prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-6 a chemokinu MCP-1 (Donato *et al.* 2008). Tyto poznatky autoři spojují se zhoršenou funkcí endotelu starších osob vycházející ze selektivně zhoršené dilatace tepen závislé na endotelu u

starších osob (Donato *et al.* 2008). Za zmínku stojí i snížená exprese I κ B α - inhibitoru NF- κ B - v endoteliálních buňkách starších osob (Donato *et al.* 2008).

Senescenční endoteliální buňky mají oproti normálním endoteliálním buňkám změněný fenotyp. Jsou plošší, větší a vykazují zvýšenou polyploidizaci (Wagner *et al.* 2001; Tian & Li 2014). Senescenční endoteliální buňky podléhají častěji apoptóze v porovnání s mladými endoteliálními buňkami (Wagner *et al.* 2001). Fibroblasty vykazují při senescenci stabilní zástavu buněčného cyklu v G1 fázi, oproti tomu se u endoteliálních buněk zřejmě ustanovuje dynamická rovnováha mezi apoptózou a zastavením buněčného cyklu v G1, s tím, že malá část buněk (<5% kultury senescenčních endoteliálních buněk) si zachovává schopnost replikace DNA (Wagner *et al.* 2001).

Mezi další změny charakteristické pro senescenci endoteliálních buněk patří například změněná exprese, funkce a signalizace ICAM-1 (Zhou *et al.* 2006). Senescenční endoteliální buňky mají sice zvýšenou expresi ICAM-1, ale produkované molekuly ICAM-1 zůstávají v cytoplazmě a mají problém s transportem do cytoplazmatické membrány (Zhou *et al.* 2006).

Tyto a další poznatky ukazují, že senescenční endoteliální buňky mají změněné některé funkce a podléhají častěji apoptóze. Se stářím je asociovaná zhoršená funkce endotelu a přítomnost zánětu, ke kterému by mohla přispívat BS hyperaktivitou transkripčního faktoru NF- κ B.

Senescenční VSMCs se aktivně podílejí na procesu AS produkcí prozánětlivých mediátorů. Senescenční VSMCs produkují IL-1 α , který autokrinně aktivuje komponenty SASP a může i parakrinně působit na okolní VSMCs a endoteliální buňky podporou zánětlivého a adhezivního stavu (Gardner *et al.* 2015). Senescenční VSMCs také stimulují prostřednictvím SASP chemotaxi monocytů a lymfocytů (například sekrecí chemokinu MCP-1) (Gardner *et al.* 2015). Další negativní vlastností senescenčních VSMCs je jejich sekrece proteáz, například MMP-9 degradující kolagen, což se spolu se sníženou sekrecí kolagenu může podílet na nestabilitě aterosklerotických plaků (Gardner *et al.* 2015). Nízká proliferace senescenčních VSMCs se také může podílet na nestabilitě plaků snížením množství VSMCs ve fibrózním povlaku a zhoršením oprav trhlin (Gardner *et al.* 2015).

Další informace o senescenci VSMCs přinesla studie Wang *et al.* (2015), kteří pracovali s vazebnými proteiny telomer, především pak ukázali funkci ochranného proteinu TRF2 při senescenci VSMCs. Snížená exprese a vazba TRF2 na telomery byla nalezena u VSMCs z lidských aterosklerotických plaků, což souviselo i s vyšším poškozením DNA u telomer a

aktivací odpovědi na poškození DNA (Wang *et al.* 2015). Na myším modelu AS autoři ukázali, že exprese TRF2 vede k překonání senescence a k proliferaci VSMCs, kdežto exprese dysfunkční mutantní formy TRF2^{T188A} vedla k senescenci a snížení proliferace VSMCs (Wang *et al.* 2015). Další experimenty s expresí TRF2 a jeho mutantní formy ve VSMCs a v myším modelu AS ukázaly, že TRF2 pozitivně působí na opravy DNA, tloušťku fibrózní vrstvy, velikost nekrotického jádra, přičemž exprese mutantní formy TRF2^{T188A} zpomalovala opravy DNA a podporovala velikost plaků a nekrotického jádra (Wang *et al.* 2015). Vezmeme-li v potaz zjištěnou sníženou expresi TRF2 u lidských aterosklerotických plaků, kterou autoři do určité míry simulovali expresí mutantní formy TRF2^{T188A}, jejich výsledky celkově naznačují, že TRF2 je schopný regulovat senescenci VSMCs, která podporuje celkovou patogenezi AS, formaci nekrotického jádra a oslabení fibrózní vrstvy (Wang *et al.* 2015). Za zmínku stojí i studie, která nasvědčuje roli senescenčních VSMCs při kalcifikaci *tunica media* (Nakano-Kurimoto *et al.* 2009).

Jak už bylo dříve řečeno, monocyty infiltrují *tunica intima*, maturují v makrofágy a mění se po pohlcení oxidovaného LDL na pěnové buňky. Senescenční pěnové buňky se vyskytují ve velkém množství v počátečních fázích formace aterosklerotického plaku a produkcí prozánětlivých cytokinů a chemotaktických faktorů monocytů napomáhají rozvoji plaku (Childs *et al.* 2016).

Makrofágy mohou pohlcovat i nahromaděné LDL (agregované například pomocí enzymu sfingomyelinázy), které se posléze oxiduje v lyzosomech (Ahmad & Leake 2019). Nativní a ve vyšší míře pak agregované LDL dokázaly vyvolat změnu pH lyzozomů a zároveň i indukci senescence samotných makrofágů (Ahmad & Leake 2019). Pod vlivem LDL vykazují makrofágy stimulované lipopolysacharidy vyšší produkci zánětlivých cytokinů (Ahmad & Leake 2019). Vzhledem k tomu, že Ahmad a Leake (2019) dokázali tyto procesy inhibovat pomocí lyzozomotropního antioxidantu cysteaminu, tento náález nasvědčuje tomu, že změny související s pohlcováním LDL makrofágy vycházejí z oxidace LDL částic v lyzosomech.

V pokročilých fázích se v aterosklerotickém plaku objevují tři morfologické typy senescenčních buněk, které podporují chemotaxi monocytů, rozvoj zánětu a degradaci extracelulární matrix. Senescenční buňky v aterosklerotických placích vykazují zvýšenou expresi součástí SASP (například IL1 α , MCP-1, MMP12 a MMP13), které pomáhají právě chemotaxi monocytů, zánětlivému prostředí a proteolýze (Childs *et al.* 2016).

BS se tedy projevuje napříč procesem aterosklerózy a zasahuje všechny tři hlavní třídy buněk účastnících se jejího průběhu. Senescenční buňky poté přímo napomáhají patogenezi AS různými mechanismy, hlavně však produkcí prozánětlivých faktorů SASP.

3. Úloha buněčné senescence v osteoartritidě

Osteoartritida je zánětlivé onemocnění kloubů, při kterém je způsobena ztráta funkce kloubů v důsledku remodelace kostní tkáně, degradace kloubní chrupavky a zánětu synoviální tekutiny vedoucí k degeneraci kloubů - osteoartróze (shrnutí v Aaron & Racine 2013).

Zcela zásadní důkaz o roli BS během patogeneze osteoartritidy přinesla studie Xu *et al.* (2017), kteří vnesli senescenční fibroblasty do kloubů myši a pozorovali fenotyp výrazně podobný osteoartritidě. Následkem transplantace senescenčních buněk kloubu myši vykazovaly silné poškození kloubní chrupavky a menisku, subchondrální změny struktury kostní tkáně a další znaky osteoartritidy (Xu *et al.* 2017). Myší modely také vykazovaly zvýšenou bolest a zhoršení lokomotorických funkcí následkem transplantace senescenčních buněk do kolenních kloubů (Xu *et al.* 2017). Studie tedy přinesla důkazy o tom, že senescenční buňky mohou svým zánětlivým působením přímo způsobovat osteoartrózu (Xu *et al.* 2017).

4. Neurodegenerativní onemocnění a buněčná senescence

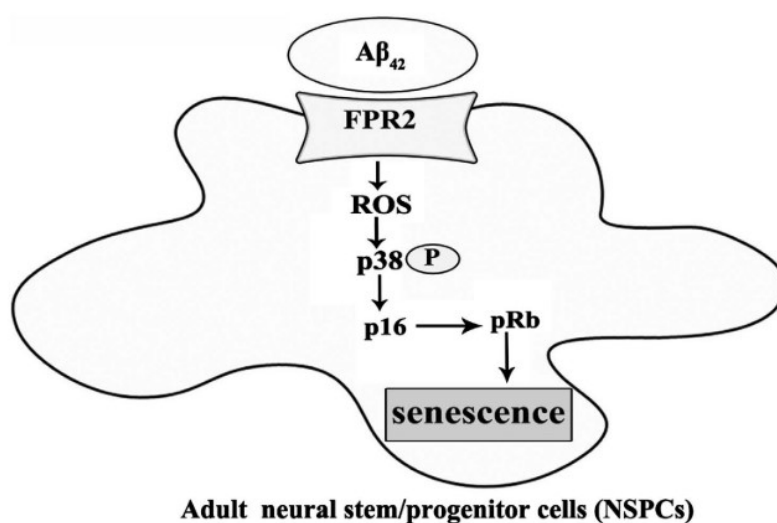
4.1. Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je dle amyloidové hypotézy charakterizována postupným ukládáním amyloidu β 42 ($A\beta$ 42) v mozkové tkáni, které nakonec společně se zánětlivou činností astrocytů a mikroglíí vede ke vzniku plaku, který společně s dalšími faktory způsobuje dysfunkci neurální tkáně a selektivní ztrátu neuronů s deficitem neurotransmiterů, což ve finálním stádiu končí demencí (shrnutí v Selkoe & Hardy 2016). Součástí patogeneze Alzheimerovy choroby je i vznik takzvaných neurofibrilárních klubek tvořených z akumulovaného hyperfosforylovaného tau proteinu uvnitř těl neuronů (shrnutí v Selkoe & Hardy 2016). Alzheimerova choroba dle této hypotézy vzniká na základě mutací v genech pro APP (amyloidový prekurzorový protein) a presenilin (katalytická podjednotka γ -sekretázy), nebo na základě chyby v odbourávání amyloidu β (shrnutí v Selkoe & Hardy 2016).

Roli buněčné senescence v patogenezi Alzheimerovy choroby podporují zjištění zvýšených koncentrací se senescencí spojených biomarkerů u pacientů s Alzheimerovou chorobou, z nichž lze například zmínit zvýšenou neurální expresi $p16^{INK4a}$ (Arendt *et al.* 1996; McShea *et al.* 1997) a zvýšenou expresi $p53$ v mozkové tkáni pacientů s Alzheimerovou chorobou v porovnání se stejně starými lidmi netrpícími Alzheimerovou chorobou (de la Monte

et al. 1997). Zajímavé je v této souvislosti i zvýšení aktivace kinázy p38 MAP v počátečních fázích Alzheimerovy choroby (Pei *et al.* 2001; Sun *et al.* 2003).

S důležitými poznatky přišla studie neurálních kmenových/progenitorových buněk NSPCs (*neural stem/progenitor cells*) izolovaných z hipokampu dospělých myši, která ukázala vlastnost A β 42 vyvolávat BS v NSPCs (He *et al.* 2013). He *et al.* (2013) ve své studii představili integrovaný model, dle kterého A β 42 aktivuje FPR2, který poté vysílá signál přes ROS-p38 MAP kinázovou signální dráhu (Obr. 4). Autoři také pracovali s transgenním myším modelem (APP/presenilin1), který vykazoval vyšší počet senescenčních NSPCs v *gyrus dentatus* a vyšší expresi p16 oproti divokému typu myši (He *et al.* 2013).



Obrázek 4 – Navržený integrovaný model působení amyloidu β 42 na neurální kmenovou/progenitorovou buňku NSPCs. Amyloid β 42 aktivuje signalizaci přes formylpeptidový receptor 2, který dále aktivuje dráhu ROS-p38 MAPK vyvolávající senescenci neurálních kmenových/progenitorových buněk. Převzato z (He *et al.* 2013).

V další studii byla podobně jako u NSPCs zjištěna vlastnost A β 42 vyvolávat senescenci astrocytů *in vitro* (Bhat *et al.* 2012). Bhat *et al.* (2012) dále ve své studii našli relativně vysoké počty senescenčních astrocytů u pacientů s Alzheimerovou chorobou a stárnoucích pacientů obecně. *In vitro* senescenční astrocyty vykazovaly zvýšenou produkci prozánětlivého cytokinu IL-6, jenž je dle autorů nejspíše regulovaný kinázou p38 MAP. Její aktivita je zvýšená během senescence astrocytů a její inhibice vedla k potlačení sekrece IL-6 senescenčními astrocyty (Bhat *et al.* 2012).

Ve své hypotéze Golde a Miller (2009) předkládají roli buněčné senescence v Alzheimerově chorobě jako součást zánětlivého cyklu. BS dle autorů může přispívat k zánětu a přes další procesy způsobovat zánik neuronů vedoucí až selhání mozku. Autoři dále ve své práci postulují, že zánětlivá a oxidační činnost během Alzheimerovy choroby urychluje přechod

neuronů do stavu podobnému buněčné senescenci. Dle autorů hypotézy budou tyto senescenční neurony charakteristické neschopností správné reakce na růstové faktory a sekrecí se senescencí asociovaných proteinů.

Přestože existují i další důkazy o roli buněčné senescence v Alzheimerově chorobě (viz shrnutí Kritsilis *et al.*, 2018), přesný proces působení buněčné senescence během patogeneze Alzheimerovy choroby není zatím znám.

4.2. Parkinsonova nemoc

Parkinsonova nemoc se řadí mezi neurodegenerativní onemocnění a její patogenezi charakterizuje ztráta dopaminergních neuronů a nahromadění struktur ze špatně složeného α -synukleinu takzvaných Lewyho tělísek (shrnutí v Rizek *et al.* 2016).

Vzorky *substantia nigra pars compacta* pacientů se sporadickým Parkinsonovým onemocněním nesou znaky buněčné senescence: vyšší expresi p16^{INK4a} a faktorů SASP MMP-3, IL-6, IL-1 α , IL-8 (Chinta *et al.* 2018). Zejména pak byla BS detekována, podobně jako u dříve zmiňované Alzheimerovy choroby (Bhat *et al.* 2012), u astrocytů ve vzorcích *substantia nigra pars compacta* z autopsie pacientů s Parkinsonovou nemocí (Chinta *et al.* 2018). Autoři se ve své studii zaměřili na účinky oxidantu paraquatu, herbicidu, který dle jejich výsledků vyvolává buněčnou senescenci v lidských kulturách astrocytů a myším modelu Parkinsonovy choroby, čímž přispívá k patogenezi Parkinsonovy choroby (Chinta *et al.* 2018).

Vyšší koncentraci MMP-3 u pacientů s Parkinsonovou nemocí v porovnání s kontrolou prokázala i další zajímavá studie (Choi *et al.* 2011). Autoři přišli se zjištěním, že MMP-3 se vyskytuje s α -synukleinem v Lewyho tělískách a dále zjistili, že MMP-3 je schopná štěpit α -synuklein a jeho mutantní formu A53T na fragmenty, přičemž vzniknuvší peptid z fragmentu 1-93 aminokyseliny vyvolává mitochondriální toxicitu (Choi *et al.* 2011). Fragment 1-93 vznikal ve větší míře právě štěpením mutantní formy A53T (Choi *et al.* 2011). Zvýšení exprese A53T synukleinu a jeho fragmentu A53T 1-93 vedlo u potkaního modelu k degeneraci dopaminergních neuronů v *substantia nigra* (Choi *et al.* 2011). Mutantní synuklein A53T byl poté schopen tvořit inkluze podobné Lewyho tělískům (Choi *et al.* 2011). Tyto výsledky jsou, co se týče otázky buněčné senescence, zvláště zajímavé, vezmeme-li v potaz, že katalyticky aktivní forma MMP-3 byla indukovaná v potkaním modelu dopaminergních neuronů (buňky N27) po aplikaci stresorů, například H₂O₂ nebo 6-hydroxydopaminu (Choi *et al.* 2011). Za zmínku stojí v souvislosti s uvedenou studií ještě práce, ve které Park, Davis a Sue (2018)

shrnutí nejnovější poznatky o mitochondriální dysfunkci, kterou řadí mezi důležité přispěvatele k patogenezi Parkinsonovy nemoci.

Vyšší aktivita β -galaktosidázy byla objevena ve vzorcích cerebrospinální tekutiny pacientů s Parkinsonovou chorobou v porovnání s kontrolními vzorky (van Dijk *et al.* 2013). Autoři dokonce testovali i možnost použití β -galaktosidázy ve spojení se zjištěnou vyšší aktivitou katepsinu E a sníženou aktivitou α -fukosidázy jako biomarkerů Parkinsonovy nemoci, nicméně citlivost a specifita takového testu byla příliš nízká.

Zajímavé jsou i zvýšené hodnoty cytokinů u pacientů s Parkinsonovou chorobou. Zvýšená koncentrace IL-6 a IL-2 byla nalezena ve vzorcích ventrikulární cerebrospinální tekutiny pacientů s Parkinsonovou chorobou. U pacientů, u kterých se choroba manifestovala již před čtyřicátým rokem života, byly naměřeny naopak zvýšené koncentrace IL-1 β , IL-2 a IL-4 (Mogi *et al.* 1996).

Přes relativně velké množství studií Parkinsonovy choroby není role BS v její patogenezi stále jasná a důkazy jsou převážně nepřímé. Další výzkum v tomto ohledu by se měl zaměřit, kromě získání dalších důkazů o existenci BS v mozkové tkáni během patogeneze Parkinsonovy choroby, i na objevení základních mechanismů BS během tohoto onemocnění. Například, zda existuje spojení mezi zmíněnou katalyticky aktivní formou MMP-3 indukovanou v potkaním modelu dopaminergních neuronů pomocí stresorů (Choi *et al.* 2011) a BS.

4.3. Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza je chronické zánětlivé onemocnění mozku, které ve své finální fázi znamená formaci sklerotických plaků (shrnutí v Compston & Coles 2008). Sklerotický plak se tvoří následkem zánětlivých procesů, demyelinizace, astrocytózy (zvýšení počtu astrocytů), neurální a axonální degenerace (shrnutí v Compston & Coles 2008; shrnutí v Thompson *et al.* 2018). Mezi symptomy patří například únava, poruchy kognitivních funkcí, problémy se zrakem či bolest (shrnutí v Thompson *et al.* 2018).

Ve většině případů je roztroušená skleróza charakterizována dvěma typickými fázemi. Nejdříve nastává takzvaná *relaps remitentní* (RR) fáze charakterizovaná střídáním relapsů akutních neurologických deficitů a remisí. RR poté postupuje do *sekundárně progresivní* (SP) fáze, kterou charakterizuje progresivní postižení (shrnutí v Compston & Coles 2008; shrnutí v Thompson *et al.* 2018).

Existuje zatím velmi málo studií zabývajících se rolí BS v patogenezi roztroušené sklerózy, přestože charakteristika nemoci tomu do určité míry napovídá, například přítomností

chronického zánětu. V potaz také musíme vzít vazbu nemoci na věk, který je nezávislým faktorem majícím vliv na průběh nemoci (Scalfari *et al.* 2011). Klíčový je v tomto ohledu ve většině případů přechod z RR fáze do SP fáze, který je asociován se stářím (Scalfari *et al.* 2011). Stáří pacienta ovlivňuje patogenezi roztroušené sklerózy především zvýšením pravděpodobnosti přechodu do SP fáze nezávisle na délce trvání nemoci, podobně takto funguje i věk pacienta na začátku RR fáze (Scalfari *et al.* 2011).

S důležitými poznatky přišli Kritsilis *et al.* (2018), když našli pomocí histochemické detekce gliového markeru GL13 (Evangelou *et al.* 2017) gliové buňky pozitivní na lipofuscin (biomarker BS) v akutně aktivních a chronicky aktivních demyelinizovaných lézích bílé hmoty u pacientů se sekundárně progresivní roztroušenou sklerózou. Oproti tomu našli málo senescenčních buněk v chronicky inaktivních lézích a žádné senescenční buňky v normální bílé hmotě. Fenotyp podobný buněčné senescenci vykazovaly i neurony subpiálních kortikálních lézí a normální mozkové kůry (Kritsilis *et al.* 2018).

BS by teoreticky mohla mít negativní vliv na proces případné remyelinizace demyelinizovaných lézí. Prekursorové buňky oligodendrocytů jsou totiž schopné pod vlivem genu *Ecr4* přejít do senescence (Kujuro *et al.* 2010). *Ecr4* vyvolává senescenci neurálních progenitorů a prekursorů oligodendrocytů minimálně zčásti pomocí proteazomální degradace cyklinů D1 a D3, zároveň byla objevena zvýšená exprese *Ecr4* u těchto buněk ve stárnoucím mozku společně se zvýšenou aktivitou SA β -galaktosidázy (Kujuro *et al.* 2010). Zvýšená exprese *Ecr4* byla objevena i v neuronech stárnoucího mozku, například v Purkyňových buňkách mozečku (Kujuro *et al.* 2010).

Remyelinizace se alespoň u části pacientů v určité míře udržuje po celou dobu trvání nemoci (Patrikios *et al.* 2006; Patani *et al.* 2007). Pacienti, kteří zemřeli ve vyšším věku následkem dlouhého trvání nemoci, vykazují vyšší remyelinizaci než pacienti, kteří zemřeli dříve (Patrikios *et al.* 2006). Ze studie vyplývá dvojí rozdělení případů. Pouze část případů totiž vykazuje extenzivní remyelinizaci oproti případům vykazujícím víceméně minimální remyelinizaci (Patrikios *et al.* 2006). Dvojí rozdělení může být vysvětleno inhibicí maturace oligodendrocytů (Patrikios *et al.* 2006), kterou pro případ roztroušené sklerózy navrhl již dříve práce zabývající se signální dráhou Jagged-Notch-Hes (John *et al.* 2002). Cytokin TGF- β 1 dle autorů indukuje faktor Jagged1 v astrocytech. Jagged1 poté aktivuje Notch1 receptor prekursorů oligodendrocytů, což způsobuje indukci efektorového transkripčního faktoru Hes5, který inhibuje proces dozrávání oligodendrocytů (John *et al.* 2002), což by teoreticky mohl být jeden z mechanismů způsobující pozorované selhání remyelinizace (Patrikios *et al.* 2006).

Studium role BS v patogenezi roztroušené sklerózy je v počátcích a teprve další experimentální práce prokáže její přesnou úlohu. Zajímavá je především senescence prekursorů oligodendrocytů. Pokud by další studie potvrdily přítomnost senescenčních buněk v mechanismu nedostatečné remyelinizace, mohla by se teoreticky BS stát atraktivním cílem léčby.

5. Úloha buněčné senescence v patogenezi obezity

Obezita, charakterizovaná Světovou zdravotnickou organizací WHO (*World Health Organization*) jako hodnota indexu tělesné hmotnosti (BMI) rovná nebo převyšující 30 kg/m² u dospělé populace, je především způsobena přebytečným příjmem energie, jejím nedostatečným výdejem a genetickými predispozicemi (shrnutí v Hajer *et al.* 2008). Zdá se sice, že u části případů může probíhat obezita bez větších komplikací (Iacobellis *et al.* 2005), ve většině případů však pacienti s obezitou vykazují změněné funkční schopnosti adipocytů, makrofágů a s tím související přítomnost mírného chronického zánětu (shrnutí v Hajer *et al.* 2008). Obezita je spojena s vyšším rizikem diabetu (studie u žen), ale souvisí i s dalšími dysfunkcemi, například neuropsychiatrickými (Colditz *et al.* 1995; shrnutí v Gariepy *et al.* 2009).

Na základě experimentů s myšími modely způsobuje obezita vyšší produkci ROS v adipocytech (Furukawa *et al.* 2004). Adipocyty vystavené oxidačnímu stresu změnily svoji sekreci, exprimovaly více PAI-1, IL-6 a MCP-1 (Furukawa *et al.* 2004). S obezitou asociovaná zvýšená produkce ROS a jejich sekrece do periferní krve by mohla být spojená s dalšími poruchami, jmenovitě například s rezistencí kosterních svalů a tukové tkáně vůči inzulínu nebo aterosklerózou či zvýšeným krevním tlakem (Furukawa *et al.* 2004). Autoři navrhuji následující mechanismus účinku ROS v tukové tkáni: následkem zvýšené koncentrace mastných kyselin v akumulované tukové tkáni se aktivuje NADPH oxidáza NOX4, což vede ke zvýšené produkci ROS. Zvýšená produkce ROS je poté schopna zpětně zvýšit expresi NOX4, čímž se uzavírá cyklus amplifikace oxidačního stresu v tukové tkáni a v krvi (Furukawa *et al.* 2004).

U myšího modelu obezity a diabetu *Ay* dochází ke změnám v tukové tkáni podobným senescenci, které jsou charakterizovány zvýšenou aktivitou SA β -galaktosidázy, zvýšenou produkcí p53, zvýšenou expresí p21 a také zvýšenou koncentrací ROS (Minamino *et al.* 2009). Podobně jako v předešlé studii (Furukawa *et al.* 2004) i zde byla zaznamenána zvýšená exprese prozánětlivých látek asociovaných s buněčnou senescencí a aktivací SASP, například TNF- α a MCP-1, kdežto snížena byla naopak exprese protizánětlivého cytokinu adiponektinu (Minamino *et al.* 2009). Další práce, tentokrát u myšího modelu deficientního na telomerázu *Tert* (*telomerase reverse transcriptase deficient mice*, Δ *Tert*), tato zjištění podpořila. Tuková

tkáň u tohoto modelu vykazovala v reakci na dietu s vysokým obsahem tuků a sacharózy zvýšenou expresi TNF- α , p21, p53 a vyšší aktivitu SA β -galaktosidázy (Minamino *et al.* 2009).

Zvýšená exprese markeru dvouvláknových zlomů DNA histonu γ -H2AX u myších modelů *Ay* a *Δ Tert* by mohla být vysvětlena poškozením vyvolaném ROS (Minamino *et al.* 2009), zvláště vezmeme-li v potaz již zmiňovanou vyšší produkci ROS v tukové tkáni (Furukawa *et al.* 2004). Experiment s primární kulturou lidských preadipocytů vystavených peroxidu vodíku také ukázal vyšší expresi p53, TNF- α a aktivitu NF- κ B (Minamino *et al.* 2009). Pokud budeme vycházet z uvedených informací, mohli bychom si představit hypotetický model, kde vyšší koncentrace mastných kyselin vede k cyklickému navyšování oxidačního stresu, který může vyústit v poškození buněk tukové tkáně, zánětlivou reakci a BS.

Studie myšího modelu deficientního na polymerázu η (*Δ Pol η*) ukázala, že zvýšené poškození DNA a perzistentní aktivace odpovědi na poškození DNA vede k indukci senescence u adipocytů doprovázené metabolickými abnormalitami a rozvoji obezity (Chen *et al.* 2015). Abnormality metabolismu i senescence adipocytů byly sníženy po inhibici p53 pifithrinem- α (Chen *et al.* 2015). Poškození DNA vedoucí k senescenci adipocytů by hypoteticky mohlo být v tukové tkáni indukováno například výše zmiňovanou zvýšenou produkcí ROS (Furukawa *et al.* 2004; Chen *et al.* 2015).

Senescence stromálních/progenitorových buněk odvozených z tukové tkáně (ASCs, *adipose-derived stromal/progenitor cells*) vedla ke snížení jejich proliferace a adipogenní kapacity (Mitterberger *et al.* 2013). Senescenční ASCs napomáhají dysfunkci tukové tkáně především sníženou replikací a diferenciací v adipocyty a signifikantně nižší expresí adipokinů (adiponektin a leptin) v reakci na adipogenní stimulaci oproti nesenescenčním ASCs (Mitterberger *et al.* 2013).

Xu *et al.* (2015) ukázali, že senescenční progenitory tukových buněk zabraňují adipogenezi inhibicí diferenciace nesenescenčních progenitorů tukových buněk pomocí sekrece aktivinu A. Aktivin A, člen super-rodiny TGF β , je součástí různých buněčných regulačních mechanismů účastnících se mimo jiné apoptózy, proliferace a diferenciace lidských embryonálních kmenových buněk (Zaragosi *et al.* 2010). Ukazuje se také, že aktivin A sice indukuje proliferaci lidských multipotentních kmenových buněk odvozených z tukové tkáně (hMADS, *human multipotent adipose-derived stem cells*), ale zároveň působí proti jejich diferenciaci (Zaragosi *et al.* 2010). Vyšší exprese aktivinu A byla nalezena u pacientů s obezitou v porovnání se štíhlými jedinci (Zaragosi *et al.* 2010). Produkci aktivinu A potlačuje inhibice JAK (Janus kináza), která také působí částečné zlepšení adipogeneze (Xu *et al.* 2015).

Xu *et al.* (2015) na myším modelu ukázali, že senescenční buňky hrají roli také v dysfunkci tukové tkáně spojené se stárnutím. Autoři dokázali negativní účinky spojené s BS alespoň částečně zmírnit pomocí inhibice JAK, následkem této inhibice byla totiž ve stárnoucích myších pozorována částečná obnova adipogeneze, snížená ztráta tuku spojená se stárnutím či snížená cirkulace volných mastných kyselin (Xu *et al.* 2015). Podobně fungovalo i genetické odstranění senescenčních buněk, které u myší redukovalo koncentraci aktivinu A, snížilo ztrátu tuku a zvýšilo známky adipogeneze (Xu *et al.* 2015). Zdá se tedy, že senescenční buňky mají signifikantní vliv na ztráty tukové tkáně asociované se stářím a její dysfunkci (Xu *et al.* 2015).

Uvedené výsledky podporuje další studie, která rovněž ukázala u myší po odstranění senescenčních buněk snížení hladiny aktivinu A (navýšené následkem obezity indukované dietně) společně se zvýšením exprese adipogenních transkripčních faktorů a lepší adipogenní diferenciací v kultuře (Palmer *et al.* 2019). Autoři dále popsali korelaci mezi množstvím makrofágů a senescenčních buněk ve viscerální tukové tkáni *in vivo*, kterou doplnili o zjištění, že senescenční buňky jsou schopné indukovat migraci monocytů do viscerální tukové tkáně u myšího modelu obezity (Palmer *et al.* 2019). V souvislosti s tím alespoň částečné odstranění senescenčních buněk naopak vedlo ke snížení akumulace monocytů v tukové tkáni (Palmer *et al.* 2019).

Obezita je spojovaná s neuropsychiatrickými dysfunkcemi a nálezy nasvědčují pozitivní korelaci mezi obezitou a úzkostí u dospělých lidí (shrnuto v Gariepy *et al.* 2009). Obezita vyvolává vyšší úzkost také u myší (Heyward *et al.* 2012), což by mohlo vyloučit zdánlivě psychosociální původ úzkosti u lidí, minimálně to poukazuje na možnost existence jiného mechanismu způsobujícího úzkost.

V tomto smyslu přišla se zajímavými výsledky nedávná studie (Ogrodnik *et al.* 2019), kde byly u myšího modelu obezity senescenční buňky farmakologicky a farmakogeneticky odstraněny, čímž se významně snížily projevy úzkostného chování myší. Nebyl sice nalezen typ senescenčních buněk zodpovědných za úzkostné chování, ale práce ukázala na spojení BS a úzkosti asociované s obezitou (Ogrodnik *et al.* 2019). Studie dále přinesla důkazy podporující roli BS jako mechanismu způsobujícího zhoršenou neurogenezi při obezitě (Ogrodnik *et al.* 2019). Obezita dle výsledků studie vyvolává u myší senescenci gliových buněk nacházejících se blízko neurálních prekursorových buněk a nezralých neuronů a zároveň vykazujících akumulaci lipidů (*accumulation of lipids in senescence*, ALISE). Počet obou těchto typů buněk

(prekurzorových buněk a nezralých neuronů) je u obezity snížený, přičemž odstranění senescenčních buněk vedlo k jejich nárůstu (Ogrodnik *et al.* 2019).

Obezita je jedním z rizik pro vznik nádorových onemocnění, například rakoviny prsu či ledvin (shrnutí v Bianchini *et al.* 2002). Yoshimoto *et al.* (2013) spojují úlohu BS u hepatocelulárního karcinomu asociovaného s obezitou. Obezita mění rovnováhu v mikrobiomu střev (Ley *et al.* 2006). Tato změna poté nejspíš vede k vyšší mikrobiální produkci deoxycholové kyseliny, která následně indukuje aktivaci SASP ve stelárních buňkách jater (Yoshimoto *et al.* 2013). SASP poté působí v játrech prozánětlivě a karcinogenně, což napomáhá vývoji hepatocelulárního karcinomu u obezity (Yoshimoto *et al.* 2013).

Celkově je tedy spojení obezity a BS podpořeno mnoha studiemi. Ukazuje se, že senescenční buňky mohou hrát klíčovou úlohu jak při rozvoji obezity samotné tak i u nemocí s obezitou spojených. K pochopení přesných mechanismů funkce senescenčních buněk a jejich případnému využití v léčbě obezity a s obezitou spojených nemocí je nutný další výzkum.

6. Diabetes mellitus druhého typu a buněčná senescence

Diabetes mellitus druhého typu (DMDT) je onemocnění charakterizované především rezistencí k inzulínu a sníženou sekrecí inzulínu β -buňkami pankreatu (American Diabetes Association 2015). DMDT je silně propojené s obezitou, riziko vzniku DMDT je korelované s indexem tělesné hmotnosti BMI a plynule stoupá s BMI větším než 22 kg/m² (studie u žen) (Colditz *et al.* 1995).

BS by mohla vstupovat do patogeneze DMDT jako součást indukce rezistence k inzulínu. Chronický zánět, který vzniká v tukové tkáni myších modelů obezity, se zdá předcházet inzulínové rezistenci (Xu *et al.* 2003). Autoři sice na základě svých výsledků předkládají hypotézu, že za zvýšený zánět v tukové tkáni vedoucí k rezistenci k inzulínu mohou hlavně makrofágy, nicméně ukázali také schopnost vyšší exprese některých prozánětlivých genů (například *MCP-1*) u preadipocytů následkem prozánětlivé stimulace (Xu *et al.* 2003). Výsledky této studie podporuje i dříve zmíněná práce, ve které Furukawa *et al.* (2004) uvádějí zvýšenou produkci ROS spojenou s obezitou jako jednu z možných příčin rezistence k inzulínu v kosterních svalech a tukové tkáni.

Dříve uvedená studie u myšího modelu obezity a diabetu (*Ay*) taktéž ukázala vyšší expresi prozánětlivých cytokinů (například TNF- α) a navíc i biomarkerů senescence (p53 a p21) v myší tukové tkáni (Minamino *et al.* 2009). Prozánětlivá činnost vedoucí k inzulínové rezistenci je nespíš podpořena jak senescenčními adipocyty tak i senescenčními makrofágy, o čemž svědčí

objevení zvýšené exprese prozánětlivých cytokinů a p53 ve frakci bohaté na makrofágy (stromální vaskulární frakce) a zároveň i ve frakci bohaté na adipocyty (Minamino *et al.* 2009). Své výsledky autoři podpořili využitím transgenního myšího modelu se specifickým defektem p53 v adipocytech (*Ay/Trp53^{+/-}*). Model oproti kontrole vykazoval nižší rezistenci k inzulinu následkem diety obsahující vysoké množství sacharózy a tuku (Minamino *et al.* 2009). Následně autoři vytvořili transgenní model se zvýšenou expresí p53 a p21 v tukové tkáni, který dle předpokladu vykazoval při normální potravě vyšší expresi zánětlivých cytokinů, biomarkeru makrofágů (*Cd68*), zhoršenou senzitivitu k inzulinu a toleranci ke glukóze oproti kontrole (Minamino *et al.* 2009). Podobně dříve zmíněný model myši *ΔTert* oproti divokému typu vykazoval vyšší rezistenci k inzulinu a intoleranci ke glukóze u zvířat krmených potravou s vysokým obsahem tuků a sacharózy (Minamino *et al.* 2009). Transplantační experiment, při kterém byla přenesena epididymální tuková tkáň z myši *ΔTert* držené na dietě s vysokým obsahem tuku a sacharózy do divokého typu myši, ukázal zlepšení rezistence k inzulinu a intolerance ke glukóze u dárce a zároveň zhoršení senzitivity k inzulinu a tolerance ke glukóze u příjemce (Minamino *et al.* 2009). Pokud byla tuková tkáň transplantovaná do divokého typu myši z jiného divokého typu udržovaného na dietě s vysokým obsahem tuků a sacharózy, neměla transplantace žádný efekt na senzitivitu k inzulinu a toleranci ke glukóze (Minamino *et al.* 2009).

Ve vzorcích lidské tukové tkáně z diabetických pacientů byla zvýšená aktivita SA β -galaktosidázy, koncentrace p53, exprese p21 a exprese prozánětlivých cytokinů oproti vzorkům z pacientů netrpících diabetem (Minamino *et al.* 2009). Dříve zmiňovaná inhibice p53 pifithrinem- α u myšího modelu *ΔPolh* vedla ke snížení koncentrace inzulinu v plazmě a zlepšení tolerance ke glukóze (Chen *et al.* 2015). Odstranění senescenčních buněk vedlo zároveň ke zlepšení senzitivity k inzulinu a tolerance ke glukóze u myšího modelu dietou vyvolané obezity (Palmer *et al.* 2019).

BS by mohla hrát roli ve snížené sekreci inzulinu β -buňkami pankreatu. Sone a Kagawa (2005) detekovali BS v β -buňkách myšího modelu DMDT udržovaném dvanáct měsíců na dietě s vysokým obsahem tuku. Tato zvířata sice vykazovala zvýšenou proliferaci β -buněk a zvýšenou koncentraci inzulinu oproti kontrole po prvních čtyřech měsících vysokotuké diety, nicméně po dvanácti měsících už vykazovala proliferaci β -buněk sníženou oproti kontrole, přičemž koncentrace inzulinu se nelišila od kontroly přes vysokou hladinu glukózy v plazmě (Sone & Kagawa 2005). Korelace mezi BS a proliferací β -buněk byla negativní (Sone & Kagawa 2005). V myším modelu DMDT byla detekována přítomnost fosforylované kinázy p38

MAP v části β -buněk pankreatu (Sone & Kagawa 2005). Na základě svých výsledků autoři navrhli, že se senescence β -buněk pankreatu (možná indukovaná přes p38 MAP kinázovou dráhu) podílí na snížení proliferace β -buněk pankreatu a na snížení sekrece inzulínu (Sone & Kagawa 2005).

Studie na myších také poukázala na možnou roli $p16^{\text{INK4a}}$ jakožto regulátoru proliferace v Langerhansových ostrůvcích pankreatu s přibývajícím věkem (Krishnamurthy *et al.* 2006). Dle experimentů se specifickým vyčerpáním β -buněk pomocí toxinu streptozotocinu v transgenních myších, u kterých byla vyvolána buď deficeience či vyšší exprese $p16^{\text{INK4a}}$, má $p16^{\text{INK4a}}$ schopnost limitovat proliferaci β -buněk a tedy i následnou regeneraci Langerhansových ostrůvků po účincích streptozotocinu (Krishnamurthy *et al.* 2006).

Proti pouze negativní roli BS u β -buněk pankreatu svědčí zvýšená sekrece inzulínu následkem stimulace glukózou v senescenčních β -bunčkách (Helman *et al.* 2016). Zvýšení exprese $p16^{\text{INK4a}}$ vedlo u myší k indukci znaků senescence β -buněk (Helman *et al.* 2016). β -buňky s expresí $p16^{\text{INK4a}}$ dokázaly více secernovat inzulín v reakci na stimulaci glukózou nežli kontrolní buňky (Helman *et al.* 2016). Indukce exprese $p16^{\text{INK4a}}$ po dobu dvou týdnů také vylepšila toleranci ke glukóze u myšího modelu diabetu, zřejmě v důsledku vyšší sekrece inzulínu, a toto zlepšení bylo také sledovatelné během následující dvouměsíční indukce exprese $p16^{\text{INK4a}}$ (Helman *et al.* 2016). Nicméně po pěti měsících indukce $p16^{\text{INK4a}}$ se glukózová tolerance podstatně snížila, což by mohlo být v důsledku nižší proliferace β -buněk s indukovanou expresí $p16^{\text{INK4a}}$ (Helman *et al.* 2016). Dospělé myši divokého typu sice skutečně vykazovaly vyšší sekreci inzulínu následkem stimulace glukózou a vyšší expresi $p16^{\text{INK4a}}$ (oproti juvenilním myším), na druhou stranu ale jejich β -buňky méně proliferovaly, byly větší a vykazovaly zvýšenou aktivitu SA β -galaktosidázy (Helman *et al.* 2016). Studie nakonec přinesla experimentální důkazy svědčící o podobném mechanismu i u lidí, především co se týče role $p16^{\text{INK4a}}$ v senescenci indukovaném zlepšení sekrece inzulínu následkem stimulace glukózou (Helman *et al.* 2016).

Zdá se tedy, že by senescence β -buněk mohla být pozitivní součástí normálního zdravého vývoje, nicméně pokud by byla způsobena smrt β -buněk pankreatu, či dlouhodobá exprese $p16^{\text{INK4a}}$, mohlo by to mít negativní vliv na jejich schopnost regenerace a tedy i následné funkce (Krishnamurthy *et al.* 2006; Helman *et al.* 2016).

Zajímavé spojení odumírání β -buněk pankreatu a obezity představuje práce, ve které Shimabukuro *et al.* (1998) experimentálně dokázali apoptózu β -buněk u potkaního modelu

obezity a DMDT v důsledku zvýšené koncentrace volných mastných kyselin, které zřejmě apoptózu indukují přes zvýšenou produkci NO a *de novo* syntézu ceramidů.

BS by mohla figurovat nejen v samotné patogenezi DMDT, ale i v procesech s DMDT spojených. Jako příklad lze uvést práci Verzola *et al.* (2008), kteří ukázali přítomnost BS v ledvinách postižených nefropatií u pacientů s DMDT, především pak v tubulárních buňkách. Aplikace média s vysokou koncentrací glukózy dokázala vyvolat senescenční změny v kulturách proximálních tubulárních buněk, což svědčí o možném negativním působení hyperglykemického metabolického stresu na ledviny (Verzola *et al.* 2008). Biomarkery BS zároveň do určité míry korelovaly s patologickými změnami struktury ledvin, například s tubulární atrofií či s glomerulárními ischemickými lézemi (Verzola *et al.* 2008). BS tedy pravděpodobně hraje roli v mechanismu poškození ledvin během diabetické nefropatie (Verzola *et al.* 2008). Podobně experimentální odstranění senescenčních buněk u myšího modelu obezity způsobilo snížení poměru albuminu ku kreatininu v moči (ACR, test na indikaci dysfunkce ledvin) (Palmer *et al.* 2019).

Roli BS v DMDT podporuje mnoho důkazů, ať už ve spojení s rezistencí k inzulínu nebo jeho sníženou sekrecí β -buněk pankreatu. Další experimentální práce by mohla roli BS v patogenezi DMDT více přiblížit a ukázat na přesný mechanismus vzniku a působení BS během DMDT.

Závěr

Naše pochopení BS se výrazně prohloubilo od doby jejího objevení v 60. letech minulého století. Od počátečního popisu fenoménu, který zabraňoval nekonečné kultivaci buněk, se BS jeví nyní komplexním mechanismem ovlivňujícím fyziologii a patologii organismů. Úspěchy výzkumu BS vedly k odhalení účasti senescenčních buněk u řady nemocí spojených se stárnutím. Tato práce shrnuje dosavadní poznatky ukazující úlohu BS v těchto chorobách. Doposud největší pokroky byly v tomto směru dosaženy u nádorových onemocnění, kde má BS zřejmě ambivalentní postavení. Na jednu stranu figuruje jako účinná primární bariéra proti manifestaci onkogenních mutací, na stranu druhou je schopna podporovat nádorové bujení a účastní se i negativních efektů spojených s jeho léčbou. Oproti tomu je působení senescenčních buněk výrazně negativní v procesu tvorby aterosklerotického plaku. Senescence všech tří hlavních typů buněk (endoteliálních buněk, VSMCs a infiltrujících imunitních buněk) pravděpodobně výrazně napomáhá nestabilitě celé struktury cévní stěny především sekrecí prozánětlivých faktorů. Oproti všem ostatním uvedeným chorobám první nálezy u myši velice úspěšně demonstrují, že by BS mohla být přímo jednou z příčin patogeneze osteoartritidy. Další experimentální práce by se tak mohla zaměřit na prokázání tohoto mechanismu u lidí. V případě často propojené patogeneze obezity a DMDT je BS podpořena mnohými důkazy a zřejmě figuruje v dysfunkci tukové tkáně, rezistenci k inzulinu a produkci inzulinu β -buňkami pankreatu. Nejméně přímých důkazů existuje o roli BS během neurodegenerativních onemocnění – Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy nemoci a roztroušené sklerózy. U těchto onemocnění jsou poznatky týkající se BS v začátcích a je velmi těžké předpovědět, jestli další práce v této oblasti odhalí silnou roli BS během patogeneze neurodegenerativních chorob.

Výzkum role BS je u většiny uvedených onemocnění v počátcích. Ukazuje se ale už nyní důležitost další experimentální práce, která by mohla vyústit v lepší pochopení přesných mechanismů BS během patogeneze uvedených chorob, což by nám dovolilo případné využití ovlivnění BS v léčbě uvedených nemocí či alespoň k odstranění některých příznaků a ke zlepšení kvality života pacientů.

Použitá literatura

- Aaron, R.K. & Racine, J. (2013). Pathogenesis and Epidemiology of Osteoarthritis. *R. I. Med. J.*, 96, 19–22.
- Ahmad, F. & Leake, D.S. (2019). Lysosomal oxidation of LDL alters lysosomal pH, induces senescence, and increases secretion of pro-inflammatory cytokines in human macrophages. *J. Lipid Res.*, 60, 98–110.
- American Diabetes Association. (2015). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*, 38, S8–S16.
- Arendt, T., Rödel, L., Gärtner, U. & Holzer, M. (1996). Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 in Alzheimer's disease. *Neuroreport*, 7, 3047–3049.
- Bartkova, J., Hořejší, Z., Koed, K., Krämer, A., Tort, F., Zieger, K., *et al.* (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, 434, 864–870.
- Bartkova, J., Rezaei, N., Lontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., *et al.* (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*, 444, 633–637.
- Bavik, C., Coleman, I., Dean, J.P., Knudsen, B., Plymate, S. & Nelson, P.S. (2006). The Gene Expression Program of Prostate Fibroblast Senescence Modulates Neoplastic Epithelial Cell Proliferation through Paracrine Mechanisms. *Cancer Res.*, 66, 794 LP – 802.
- Bennett, M.R. (1999). Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc. Res.*, 41, 361–368.
- Bhat, R., Crowe, E.P., Bitto, A., Moh, M., Katsetos, C.D., Garcia, F.U., *et al.* (2012). Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. *PLoS One*, 7, e45069–e45069.
- Bianchini, F., Kaaks, R. & Vainio, H. (2002). Overweight, obesity, and cancer risk. *Lancet Oncol.*, 3, 565–574.
- Borodkina, A. V, Deryabin, P.I., Giukova, A.A. & Nikolsky, N.N. (2018). “Social Life” of Senescent Cells: What Is SASP and Why Study It? *Acta Naturae*, 10, 4–14.
- Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A.H.F.M., Schlegelberger, B., *et al.* (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature*, 436, 660–665.

- Castro, P., Xia, C., Gomez, L., Lamb, D.J. & Ittmann, M. (2004). Interleukin-8 expression is increased in senescent prostatic epithelial cells and promotes the development of benign prostatic hyperplasia. *Prostate*, 60, 153–159.
- Chen, Y.-W., Harris, R.A., Hatahet, Z. & Chou, K. (2015). Ablation of XP-V gene causes adipose tissue senescence and metabolic abnormalities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 112, E4556–E4564.
- Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.-K., Dotan, Z.A., Niki, M., *et al.* (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*, 436, 725–730.
- Childs, B.G., Baker, D.J., Wijshake, T., Conover, C.A., Campisi, J. & van Deursen, J.M. (2016). Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science* (80-.), 354, 472–477.
- Chinta, S.J., Woods, G., Demaria, M., Rane, A., Zou, Y., McQuade, A., *et al.* (2018). Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson’s Disease. *Cell Rep.*, 22, 930–940.
- Choi, D.-H., Kim, Y.-J., Kim, Y.-G., Joh, T.H., Beal, M.F. & Kim, Y.-S. (2011). Role of Matrix Metalloproteinase 3-mediated α -Synuclein Cleavage in Dopaminergic Cell Death. *J. Biol. Chem.*, 286, 14168–14177.
- Colditz, G.A., Willett, W.C., Rotnitzky, A. & Manson, J.E. (1995). Weight Gain as a Risk Factor for Clinical Diabetes Mellitus in Women. *Ann. Intern. Med.*, 122, 481–486.
- Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Barradas, M., *et al.* (2005). Senescence in premalignant tumours. *Nature*, 436, 642.
- Compston, A. & Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet*, 372, 1502–1517.
- Coppé, J.-P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D.P., Goldstein, J., *et al.* (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.*, 6, 2853–2868.
- Demaria, M., O’Leary, M.N., Chang, J., Shao, L., Liu, S., Alimirah, F., *et al.* (2017). Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discov.*, 7, 165 LP – 176.
- van Dijk, K.D., Persichetti, E., Chiasserini, D., Eusebi, P., Beccari, T., Calabresi, P., *et al.*

- (2013). Changes in endolysosomal enzyme activities in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, 28, 747–754.
- Donato, A.J., Black, A.D., Jablonski, K.L., Gano, L.B. & Seals, D.R. (2008). Aging is associated with greater nuclear NF κ B, reduced I κ B α , and increased expression of proinflammatory cytokines in vascular endothelial cells of healthy humans. *Aging Cell*, 7, 805–812.
- Evangelou, K., Lougiakis, N., Rizou, S. V, Kotsinas, A., Kletsas, D., Muñoz-Espín, D., *et al.* (2017). Robust, universal biomarker assay to detect senescent cells in biological specimens. *Aging Cell*, 16, 192–197.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., *et al.* (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.*, 114, 1752–1761.
- Gardner, S.E., Humphry, M., Bennett, M.R. & Clarke, M.C.H. (2015). Senescent Vascular Smooth Muscle Cells Drive Inflammation Through an Interleukin-1 α -Dependent Senescence-Associated Secretory Phenotype. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 35, 1963–1974.
- Garipey, G., Nitka, D. & Schmitz, N. (2009). The association between obesity and anxiety disorders in the population: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Obes.*, 34, 407.
- Golde, T.E. & Miller, V.M. (2009). Proteinopathy-induced neuronal senescence: a hypothesis for brain failure in Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *Alzheimers. Res. Ther.*, 1, 5.
- Hajer, G.R., Visseren, F.L.J. & van Haeften, T.W. (2008). Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur. Heart J.*, 29, 2959–2971.
- Hayflick, L. & Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, 25, 585–621.
- He, N., Jin, W.-L., Lok, K.-H., Wang, Y., Yin, M. & Wang, Z.-J. (2013). Amyloid- β (1-42) oligomer accelerates senescence in adult hippocampal neural stem/progenitor cells via formylpeptide receptor 2. *Cell Death Dis.*, 4, e924–e924.
- Helman, A., Klochendler, A., Azazmeh, N., Gabai, Y., Horwitz, E., Anzi, S., *et al.* (2016). p16(Ink4a)-induced senescence of pancreatic beta cells enhances insulin secretion. *Nat. Med.*, 22, 412–420.

- Heyward, F.D., Walton, R.G., Carle, M.S., Coleman, M.A., Garvey, W.T. & Sweatt, J.D. (2012). Adult mice maintained on a high-fat diet exhibit object location memory deficits and reduced hippocampal SIRT1 gene expression. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 98, 25–32.
- Iacobellis, G., Ribaudo, M.C., Zappaterreno, A., Iannucci, C.V. & Leonetti, F. (2005). Prevalence of Uncomplicated Obesity in an Italian Obese Population. *Obes. Res.*, 13, 1116–1122.
- John, G.R., Shankar, S.L., Shafit-Zagardo, B., Massimi, A., Lee, S.C., Raine, C.S., *et al.* (2002). Multiple sclerosis: Re-expression of a developmental pathway that restricts oligodendrocyte maturation. *Nat. Med.*, 8, 1115.
- Krishnamurthy, J., Ramsey, M.R., Ligon, K.L., Torrice, C., Koh, A., Bonner-Weir, S., *et al.* (2006). p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature*, 443, 453–457.
- Kritsilis, M., V Rizou, S., Koutsoudaki, P.N., Evangelou, K., Gorgoulis, V.G. & Papadopoulos, D. (2018). Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 2937.
- Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.Y. & Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98, 12072–12077.
- Kujuro, Y., Suzuki, N. & Kondo, T. (2010). Esophageal cancer-related gene 4 is a secreted inducer of cell senescence expressed by aged CNS precursor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107, 8259–8264.
- Kwon, G.P., Schroeder, J.L., Amar, M.J., Remaley, A.T. & Balaban, R.S. (2008). Contribution of Macromolecular Structure to the Retention of Low-Density Lipoprotein at Arterial Branch Points. *Circulation*, 117, 2919–2927.
- de la Monte, S.M., Sohn, Y.K. & Wands, J.R. (1997). Correlates of p53- and Fas (CD95)-mediated apoptosis in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.*, 152, 73–83.
- Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S. & Gordon, J.I. (2006). Human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444, 1022–1023.
- Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T. & Housman, D.E. (1993). p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*, 74, 957–967.

- McShea, A., Harris, P.L., Webster, K.R., Wahl, A.F. & Smith, M.A. (1997). Abnormal expression of the cell cycle regulators P16 and CDK4 in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.*, 150, 1933–1939.
- Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M.A.M., *et al.* (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*, 436, 720–724.
- Minamino, T., Orimo, M., Shimizu, I., Kunieda, T., Yokoyama, M., Ito, T., *et al.* (2009). A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat. Med.*, 15, 1082.
- Mitterberger, M.C., Lechner, S., Zwerschke, W. & Mattesich, M. (2013). Adipogenic Differentiation Is Impaired in Replicative Senescent Human Subcutaneous Adipose-Derived Stromal/Progenitor Cells. *Journals Gerontol. Ser. A*, 69, 13–24.
- Mogi, M., Harada, M., Narabayashi, H., Inagaki, H., Minami, M. & Nagatsu, T. (1996). Interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor- α levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.*, 211, 13–16.
- Nakano-Kurimoto, R., Ikeda, K., Uraoka, M., Nakagawa, Y., Yutaka, K., Koide, M., *et al.* (2009). Replicative senescence of vascular smooth muscle cells enhances the calcification through initiating the osteoblastic transition. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, 297, H1673–H1684.
- Noren Hooten, N. & Evans, M.K. (2017). Techniques to Induce and Quantify Cellular Senescence. *J. Vis. Exp.*, 10.3791/55533.
- Ogrodnik, M., Zhu, Y., Langhi, L.G.P., Tchkonja, T., Krüger, P., Fielder, E., *et al.* (2019). Obesity-Induced Cellular Senescence Drives Anxiety and Impairs Neurogenesis. *Cell Metab.*, 29, 1–17.
- Palmer, A.K., Xu, M., Zhu, Y., Pirtskhalava, T., Weivoda, M.M., Hachfeld, C.M., *et al.* (2019). Targeting senescent cells alleviates obesity-induced metabolic dysfunction. *Aging Cell*, e12950.
- Park, J.-S., Davis, R.L. & Sue, C.M. (2018). Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: New Mechanistic Insights and Therapeutic Perspectives. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, 18, 21.

- Patani, R., Balaratnam, M., Vora, A. & Reynolds, R. (2007). Remyelination can be extensive in multiple sclerosis despite a long disease course. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 33, 277–287.
- Patrikios, P., Stadelmann, C., Kutzelnigg, A., Rauschka, H., Schmidbauer, M., Laursen, H., *et al.* (2006). Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain*, 129, 3165–3172.
- Pei, J., Braak, E.W.M. Van Den, Braak, H., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Winblad, B., *et al.* (2001). Localization of active forms of C-jun kinase (JNK) and p38 kinase in Alzheimer's disease brains at different stages of neurofibrillary degeneration. *J. Alzheimers. Dis.*, 3 1, 41–48.
- Rizek, P., Kumar, N. & Jog, M.S. (2016). An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease. *CMAJ*, 188, 1157–1165.
- Sakakura, K., Nakano, M., Otsuka, F., Ladich, E., Kolodgie, F.D. & Virmani, R. (2013). Pathophysiology of Atherosclerosis Plaque Progression. *Hear. Lung Circ.*, 22, 399–411.
- Scalfari, A., Neuhaus, A., Daumer, M., Ebers, G.C. & Muraro, P.A. (2011). Age and disability accumulation in multiple sclerosis. *Neurology*, 77, 1246–1252.
- Selkoe, D.J. & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.*, 8, 595–608.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D. & Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88, 593–602.
- Shimabukuro, M., Zhou, Y.T., Levi, M. & Unger, R.H. (1998). Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95, 2498–2502.
- Sone, H. & Kagawa, Y. (2005). Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. *Diabetologia*, 48, 58–67.
- Sun, A., Liu, M., Nguyen, X. V & Bing, G. (2003). P38 MAP kinase is activated at early stages in Alzheimer's disease brain. *Exp. Neurol.*, 183, 394–405.
- Thompson, A.J., Baranzini, S.E., Geurts, J., Hemmer, B. & Ciccarelli, O. (2018). Multiple

- sclerosis. *Lancet*, 391, 1622–1636.
- Tian, X.-L. & Li, Y. (2014). Endothelial Cell Senescence and Age-Related Vascular Diseases. *J. Genet. Genomics*, 41, 485–495.
- Verzola, D., Gandolfo, M.T., Gaetani, G., Ferraris, A., Mangerini, R., Ferrario, F., *et al.* (2008). Accelerated senescence in the kidneys of patients with type 2 diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol. Physiol.*, 295, F1563–F1573.
- Wagner, M., Hampel, B., Bernhard, D., Hala, M., Zwerschke, W. & Jansen-Dürr, P. (2001). Replicative senescence of human endothelial cells in vitro involves G1 arrest, polyploidization and senescence-associated apoptosis. *Exp. Gerontol.*, 36, 1327–1347.
- Wang, J., Uryga, A.K., Reinhold, J., Figg, N., Baker, L., Finigan, A., *et al.* (2015). Vascular Smooth Muscle Cell Senescence Promotes Atherosclerosis and Features of Plaque Vulnerability. *Circulation*, 132, 1909–1919.
- Wang, J.C. & Bennett, M. (2012). Aging and Atherosclerosis. *Circ. Res.*, 111, 245–259.
- Weber, C. & Noels, H. (2011). Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat. Med.*, 17, 1410.
- Wei, W. & Ji, S. (2018). Cellular senescence: Molecular mechanisms and pathogenicity. *J. Cell. Physiol.*, 233, 9121–9135.
- Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., *et al.* (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, 112, 1821–1830.
- Xu, M., Bradley, E.W., Weivoda, M.M., Hwang, S.M., Pirtskhalava, T., Decklever, T., *et al.* (2017). Transplanted Senescent Cells Induce an Osteoarthritis-Like Condition in Mice. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, 72, 780–785.
- Xu, M., Palmer, A.K., Ding, H., Weivoda, M.M., Pirtskhalava, T., White, T.A., *et al.* (2015). Targeting senescent cells enhances adipogenesis and metabolic function in old age. *Elife*, 4, e12997–e12997.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., *et al.* (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*, 445, 656–660.
- Yoshimoto, S., Loo, T.M., Atarashi, K., Kanda, H., Sato, S., Oyadomari, S., *et al.* (2013).

Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature*, 499, 97–101.

Zaragosi, L.-E., Wdziekonski, B., Villageois, P., Keophiphath, M., Maumus, M., Tchkonja, T., *et al.* (2010). Activin A Plays a Critical Role in Proliferation and Differentiation of Human Adipose Progenitors. *Diabetes*, 59, 2513–2521.

Zhou, X., Perez, F., Han, K. & Jurivich, D.A. (2006). Clonal senescence alters endothelial ICAM-1 function. *Mech. Ageing Dev.*, 127, 779–785.